**ARTICULATA 2017 32: 9–21 TAXONOMIE**

# DNA-Barcoding der Heuschrecken Mitteleuropas: Erfolge, Möglichkeiten, und Grenzen

Oliver Hawlitschek, Gerlind U.C. Lehmann, Arne W. Lehmann,
Stefan Schmidt, Frank Glaw & Jérôme Morinière

## Abstract

DNA barcoding is a method of species identification using a short, standardized DNA fragment, the so-called DNA barcode. In entomology, barcoding is particularly useful for identifying eggs or larvae whose identification is otherwise difficult or even impossible, and for detecting and distinguishing cryptic species. Other applications include the rapid detection of newly introduced species of pests and parasites. However, the successful use of barcoding requires a genetic database built on reliably identified reference sequences. HAWLITSCHEK et al. (2017) presented such a database for the Orthoptera of Central Europe, with a focus on Germany, Austria, and Switzerland. While all species of Ensifera can be unambiguously identified to species level by barcoding, the success rate of 59.1% for Caelifera was below average. Ten species complexes sharing barcode clusters were detected, some of them comprising two genera (e.g., *Chorthippus* + *Gomphocerippus* and *Stenobothrus* + *Myrmeleotettix*). Potential reasons are the young evolutionary age of the species and possibly horizontal gene flow between them. Thus, Orthoptera are an example for the often straightforward application of the DNA barcoding method as well as for related problems, which in turn may serve as starting points for future research. Finally, this publication reports the barcoding of 100% of German Orthoptera by the addition of the previously missing species *Ephippiger diurnus* and *Phaneroptera nana*.

## Zusammenfassung

DNA-Barcoding ist eine Methode zur Bestimmung von Arten anhand eines kurzen, standardisierten Fragments ihrer DNA, des sogenannten Barcodes. Barcoding ist im wissenschaftlichen Bereich besonders nützlich bei der Bestimmung schwer determinierbarer Eier- und Larvenstadien und der Entdeckung und Unterscheidung kryptischer Arten. Die Methode kann z.B. ohne Spezialwissen zur raschen Erfassung neu eingeschleppter Arten von Schädlingen und Parasiten genutzt werden. Zum erfolgreichen Einsatz des Barcoding ist eine genetische Datenbank sicher bestimmter Referenzsequenzen unerlässlich. In der Arbeit von HAWLITSCHEK et al. (2017) wird eine solche Datensammlung für die Heuschreckenfauna Mitteleuropas mit Schwerpunkt Deutschland, Österreich und Schweiz vorgestellt. Während alle Arten der Langfühlerschrecken durch die Barcoding-Methode eindeutig bestimmt werden konnten, waren bei Kurzfühlerschrecken nur 59,1% der Arten unterscheidbar, was eine deutlich unterdurchschnittliche Erfolgsrate darstellt. So wurden zehn Komplexe gefunden, deren Arten denselben

Barcode-Clustern angehörten, z.T. über Gattungen hinweg (z.B. *Chorthippus* + *Gomphocerippus* und *Stenobothrus* + *Myrmeleotettix*). Als Ursachen kommen das vermutlich junge evolutionäre Alter der Arten und womöglich horizontaler Genfluss in Frage. Heuschrecken sind daher ein Beispiel sowohl für die oftmals unkomplizierte Anwendbarkeit der Barcoding-Methodik als auch für die damit verbundenen Probleme, die aber wiederum neue Forschungsansätze aufzeigen können. Darüber hinaus berichtet diese Publikation über das Barcoding von 100% der in Deutschland vorkommenden Orthoptera durch das Hinzufügen der zuvor fehlenden Arten *Ephippiger diurnus* und *Phaneroptera nana*.

## Einleitung

Der kürzlich erschienene Artikel "DNA barcoding of crickets, katydids and grasshoppers (Orthoptera) from Central Europe with focus on Austria, Germany and Switzerland" von HAWLITSCHEK et al. (2017) beschreibt die Ergebnisse einer vorwiegend an der Zoologischen Staatssammlung München (SNSB-ZSM) durchgeführten genetischen Studie über die Orthopteren Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Im hier vorliegenden Artikel wird die zuvor genannte Arbeit in deutscher Sprache zusammengefasst. Außerdem werden Hintergründe und Anwendungsmöglichkeiten des DNA-Barcoding erklärt und die Ergebnisse mit Relevanz für die Orthopterenfauna Deutschlands diskutiert.

## Was ist DNA-Barcoding?

Seit den 1990er Jahren fanden molekulargenetische Methoden auch in der systematischen Biologie weitere Verbreitung, wo sie heute umfangreich vor allem zur Klärung von phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen eingesetzt werden. Vollständige Genome enthalten jedoch sehr viele Informationen: das menschliche Genom besteht beispielsweise aus über drei Milliarden Basenpaaren. Viele Insektengenome sind um eine Größenordnung kleiner, wobei Heuschrecken eine bemerkenswerte Ausnahme bilden; bei ihnen besitzen manche Arten Genome mit der mehrfachen Größe des menschlichen Genoms (WANG et al. 2014). In jedem Fall ist die Auswertung kompletter Genome auch heute noch sehr teuer und aufwändig und somit für die meisten Anwendungen nicht praktikabel.

Zur einfachen Artbestimmung einer unbekannten Gensequenz ist die Existenz einer Datenbank, die bereits eine Referenzsequenz des entsprechenden Organismus beinhaltet, die Voraussetzung. Auf GenBank bzw. EMBL, den wichtigsten globalen Archiven für DNA-Daten, lagern über 162 Millionen Sequenzen (Stand 2013: BENSON et al. 2013). Diese repräsentieren jedoch eine Vielzahl unterschiedlicher Genomregionen und wurden nicht mit dem Ziel gesammelt, eine Referenzdatenbank zur Artbestimmung aufzubauen. Daher schlugen HEBERT et al. (2003) als Standard zur molekularen Artbestimmung bei Tieren das Cytochrom C Oxidase I Gen (COI) vor. Dieser 658 Basenpaare lange Genabschnitt kann bei praktisch allen Tieren relativ leicht sequenziert werden. Als Gen aus der mitochondrialen DNA wird es normalerweise ausschließlich über die maternale Linie vererbt, was bei populationsgenetischen Studien berücksichtigt werden muss,

auf Artebene aber in der Regel keine Rolle spielt. COI wurde bereits seit langem bei phylogenetischen Untersuchungen verwendet (z.B. BOULTER et al. 1972, BROWN et al. 1994). Da dieser Abschnitt bei jedem Tier wie der Strichcode (engl. "Barcode") einer Ware im Supermarkt "ausgelesen" werden könnte und somit eine eindeutige Artbestimmung ermöglichen würde, wurde der Begriff des DNA-Barcoding geprägt.

Barcoding besitzt eine hohe Bandbreite an möglichen Anwendungen. Im Bereich der Biodiversitätsforschung wird die Methode inzwischen häufig zur Ersterfassung taxonomisch schlecht bearbeiteter Artengemeinschaften eingesetzt. Insbesondere bei den artenreichen Wirbellosen der Tropen stehen Taxonomen häufig sehr vielen unbestimmten und zumeist unbeschriebenen Arten gegenüber (SMITH et al. 2005, HAJIBABAEI et al. 2007, NAGY et al. 2013). Barcoding kann so eine Vorsortierung der Belegexemplare zur späteren taxonomischen Bearbeitung liefern. Fehlerhafte Artbestimmungen können bei Offenlegung der Barcodes korrigiert werden (LEHMANN et al. 2017). Daneben können kryptische Arten innerhalb bereits bekannter Arten aufgedeckt werden, die in der Folge zumeist durch morphologische und/oder ökologische Daten bestätigt werden können (HEBERT et al. 2004). Eine besonders wichtige Funktion des Barcoding ist auch die Bestimmung ansonsten unbestimmbarer Lebensstadien, meist Eier oder Larven. Im Bereich der forensischen Entomologie erlaubt dies z.B. die Bearbeitung morphologisch nicht bestimmbarer Fliegenmaden ohne deren vorherige Erbrütung (DAWNAY et al. 2007, MORINIÈRE et al., unpubl.).

Nach wie vor stellt auch das Barcoding, das ja als einfache Standardmethode etabliert werden soll, Anwender vor technische Schwierigkeiten. Die Sequenzierung von COI gelingt nicht bei allen Artengruppen mit gleich hoher Erfolgsquote, was aber durch die Fortentwicklung der Labormethoden zunehmend ausgeglichen wird. Neben diesen methodischen Problemen liegen weiterhin auch solche biologischer Natur vor. Bei einem gewissen, variablen Prozentsatz der Arten fast aller Organismengruppen ist eine Bestimmung an Hand der Barcodes nicht möglich, weil diese Arten evolutionsgeschichtlich so jung sind, dass sich im COI-Gen noch keine klaren Unterschiede herausgebildet haben oder weil noch Genfluss zwischen verwandten Arten stattfindet. So lassen sich rund 5% der in Deutschland heimischen Wildbienenarten durch Barcoding nicht sicher bestimmen (SCHMIDT et al. 2015). Darüber hinaus ist der allein auf COI beruhende Barcoding-Ansatz zwar sehr gut zur Abgrenzung von Arten und meist auch Gattungen geeignet, stellt die Verwandtschaftsverhältnisse auf höheren taxonomischen Ebenen jedoch oft nur unzureichend dar (HEBERT & GREGORY 2005). Zur zuverlässigen Rekonstruktion phylogenetischer Verhältnisse sind umfangreichere, auf einem Satz verschiedener genetischer Marker beruhender Analysen erforderlich. Somit kann DNA-Barcoding die Arbeit taxonomischer Experten deutlich erleichtern und dadurch effizienter machen, es kann und wird taxonomische Expertise aber nicht ersetzen.

## DNA-Barcoding in Deutschland

In Deutschland laufen derzeit noch die Projekte Barcoding Fauna Bavarica (BFB, http://www.faunabavarica.de/, seit 2009) und German Barcode of Life (GBOL, https://www.bolgermany.de/, seit 2012). Die Projekte zielen darauf ab, die bayerische bzw. deutsche Fauna komplett in der Barcoding-Datenbank zu erfassen. Beim derzeitigen Projektstand (2017) liegen Barcodes von ca. 20.000 Arten vor.

Auf Grund der besonderen Diversität bei Insekten hat sich Barcoding als Methode vornehmlich in der Entomologie entwickelt. Dort besteht auch besonderer Bedarf an alternativen Bestimmungsmethoden, da die Arten vieler Gruppen traditionell nur von ausgewiesenen Experten bestimmt werden können. Hinzu kommt auch, dass entomologische Trockensammlungen eine besonders gute Quelle zum Aufbau einer Barcode-Datenbank darstellen, denn Trockenmaterial ist zumeist auch nach Jahrzehnten noch gut für molekulargenetische Untersuchungen verwendbar. Anfänglich konzentrierten sich Barcoding-Projekte auf Schmetterlinge, von denen heute in vielen Ländern bereits ein Großteil der Fauna erfasst ist (HEBERT et al. 2004, HAUSMANN et al. 2013). In der Folge wurden viele andere Insektengruppen erfasst.

Zu Heuschrecken liegen insgesamt noch vergleichsweise wenige Barcoding-Daten vor. Ein Grund dafür ist, dass besonders Kurzfühlerschrecken im Vergleich zu anderen Arthropoden extrem große Genome besitzen und viele Gene neben ihrem funktionellen "Original" (Ortholog) noch in zahlreichen nicht funktionellen Kopien (Paralogs oder Pseudogene) vorliegen. Dies betrifft auch mitochondriale Gene wie COI, die dann als Kopien im Zellkern vorhanden sind. Man bezeichnet solche Kopien als NUMT (Nuclear Mitochondrial Pseudogenes; SONG et al. 2008, MOULTON et al. 2010). Diese NUMTs können, da sie nicht denselben Selektionsdrücken unterliegen wie ihr Ortholog, von dessen Originalsequenz abweichen. Werden sie statt des Orthologs sequenziert, kann ein falsches phylogenetisches Signal bzw. ein falscher Barcode die Folge sein, auch wenn tatsächlich irreführende Ergebnisse selten auftreten (BERTHIER et al. 2011). Diesem Problem kann bei Standardprotokollen nur durch sorgfältige Qualitäts- und Plausibilitätsprüfung der Daten und Ergebnisse begegnet werden.

Neben den oben beschriebenen Hauptanwendungsmethoden des Barcoding etabliert sich derzeit insbesondere die Auswertung von Massenproben als Forschungsansatz. Dabei handelt es sich z.B. um Proben aus Malaisefallen, die große Mengen verschiedener Insekten und anderer Kleintiere in Ethanol enthalten. Normalerweise müssen diese Proben langwierig nach Gruppen sortiert und dann jedes einzelne Individuum von Experten bestimmt werden. Mit einer Barcoding-Datenbank und einem Next-Generation Sequencing Ansatz genügt bereits die gelöste DNA, um eine Liste der in der Probe enthaltenen Arten zu erstellen. An der ZSM durchgeführte Pilotstudien wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich in Arbeit (MORINIÈRE et al. 2016). Ist das System etabliert, erlaubt es den weit umfangreicheren Einsatz von Malaisefallen und anderen Erkennungssystemen und kann so ganz neue, umfangreiche Daten über die Verbreitung auch bisher wenig bekannter Insektengruppen liefern bzw. auch als "Frühwarnsystem" für einwandernde Arten dienen.

## Barcoding-Datenbanken und die Erzeugung von Daten

Eine wesentliche Voraussetzung zur Funktion des Barcoding-Ansatzes ist eine umfassende und gut gepflegte Referenzdatenbank. Die Artbestimmung eines unbekannten Barcodes kann nur gelingen, wenn sich bereits eine Referenzsequenz der entsprechenden Art in der Datenbank befindet. Um die weltweite Verfügbarkeit aller Sequenzen zu gewährleisten, nutzen praktisch alle Barcoding-Projekte weltweit seit 2007 die globale BOLD Datenbank (Barcode of Life Database: RATNASINGHAM & HEBERT 2007; Abb. 1) mit Sitz an der Universität von Guelph, Kanada. Derzeit (August 2017) enthält die Datenbank über 5,6 Millionen Barcode-Sequenzen von über 179.000 beschriebenen Tierarten. Zur Qualitätssicherung muss jede Barcode-Sequenz, die BOLD zur Verfügung gestellt wird, Metadaten z.B. zu Fundort, Zeitpunkt, Sammler und Bestimmer besitzen.

PUBLIC DATA PORTAL - Specimen Record

Record Details For FBORT108-09

IDENTIFIERS

Sample ID: BC ZSM ORT 00108 Museum ID: BC ZSM ORT 00108
Field ID: BC ZSM ORT 00108 Collection Code:
Deposited In: SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen

TAXONOMY

Phylum: Arthropoda Subfamily: Tettigoniinae
Class: Insecta Genus: *Tettigonia*
Order: Orthoptera Species: *Tettigonia viridissima*
Family: Tettigoniidae Subspecies:
BIN (Cluster ID): BOLD:AAF1423

SPECIMEN DETAILS

Voucher Status: Reproduction: S
Tissue Descriptor: Sex: M
Brief Note: imago Life Stage:
Detailed Notes:

COLLECTION DATA

Country: Germany Date Collected: 2009-07-11
Province/State: Bavaria Collectors: F. Glaw
Region/County: Oberbayern
Sector:
Exact Site: Dorfen
Latitude: 48.2667 Elevation: 440 Meters
Longitude: 12.1333 Elv. Accuracy:
Coord. Source: Depth:
Coord. Accuracy: Depth Accuracy:

SEQUENCE: COI-5P [Funding Source: iBOL:WG1.5]

Sequence ID: FBORT108-09.COI-5P GenBank Accession: GU706149
Last Updated: 2017-08-14 Genome: Mitochondrial
Locus: Cytochrome Oxidase Subunit 1 5' Region
Nucleotides: 594 bp

Amino Acids:

Illustrative Barcode:

SPECIMEN IMAGES:

License: CreativeCommons - Attribution Non-Commercial Share-Alike (2010)
License Holder: Stefan Schmidt, SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen

COLLECTION SITE:

ATTRIBUTION

Specimen Depository: SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen
Sequencing Center: Biodiversity Institute of Ontario
Photography: ZSM Hymenoptera Photography Group, SNSB, Zoologische Staatssammlung Muenchen
Collectors: F. Glaw
Specimen Identification: Oliver Hawlitschek
Project Manager: Stefan Schmidt
Sequencing Support: International Barcode of Life (WG1.5)

Abbildung 1:
DNA Barcode-Eintrag auf der Internetseite der BOLD-Datenbank (http://www.boldsystems.org/). Jeder Barcode ist verknüpft mit Daten zum Fundort, Sammeldatum, Sammler, Identifizierer, Beleg und einem Belegfoto. Die Daten sind frei zugänglich.

Ein Belegexemplar sollte in einer öffentlichen Sammlung hinterlegt und der Datenbankeintrag mit einem Foto dieses Exemplars verknüpft sein. So überprüfbare Daten werden öffentlich zugänglich gemacht und können so von jedem Nutzer online abgefragt werden. Zudem werden Daten von BOLD automatisch auch auf GenBank bereitgestellt.

Barcodes werden durch Auslesen der COI-Sequenz aus einer Gewebeprobe erzeugt. Im Falle von Insekten wird dabei meist ein Bein entnommen, das genügend Gewebe zur Sequenzierung enthält. Dabei kann frisches, aber auch getrocknetes oder in Alkohol gelagertes Material verwendet werden, wobei wichtig ist, dass zur Erhaltung der DNA möglichst hoch konzentrierter reiner Alkohol (normalerweise 96%) verwendet wird.

Zur Erkennung von Arten dient das sogenannte BIN-System (Barcode Index Number; RATNASINGHAM & HEBERT 2013). Dazu wird ein Clustering-Algorithmus auf BOLD verwendet. Sequenzen innerhalb einer BIN sind zueinander deutlich ähnlicher als zu Sequenzen anderer BINs und bilden dementsprechend "Cluster". Dies entspricht der Auffassung, dass auch Gensequenzen von Individuen innerhalb einer biologischen Art durch den anhaltenden Genfluss deutlich ähnlicher zueinander sind als zu den Sequenzen anderer Arten. Tatsächlich besteht in vielen Fällen gute, allerdings nicht immer vollständige Übereinstimmung zwischen BINs und klassisch-taxonomisch definierten Arten. Das BIN-System eignet sich besonders zur Ersterfassung taxonomisch unbearbeiteter Proben, kann aber auch die Notwendigkeit der Revision taxonomisch bekannter Organismen aufzeigen.

## Ergebnisse

Der Datensatz von HAWLITSCHEK et al. (2017) beinhaltete insgesamt 748 Barcodes von Heuschrecken. Ziel war es, möglichst viele Arten aus dem Untersuchungsraum Deutschland, Österreich und Schweiz zu erfassen. Dabei wurden 114 der 138 (82,6%) aus Österreich bekannten Taxa, 85 der 87 (97,7%) Taxa aus Deutschland und 98 der 114 (86,0%) Taxa aus der Schweiz in den Datensatz eingespeist. Insgesamt wurden 122 der 162 (78,4%) Arten im Gebiet erfasst. Von manchen Arten wurde auch Proben aus anderen europäischen Ländern verwendet, um einen geografischen Kontext herzustellen.

Diese Daten sind nun in der BOLD Datenbank im Projekt DS-ORTGER (doi: dx.doi.org/10.5883/DS-ORTGER) verfügbar. Nach Abschluss des Projektes von HAWLITSCHEK et al. (2017) wurden noch die aus Deutschland fehlenden Arten *Phaneroptera nana* und *Ephippiger diurnus* mit jeweils zwei bzw. drei Barcodes bereitsgestellt. Damit sind nun 100% der Arten aus Deutschland, 84,1% aus Österreich und 87,7% aus der Schweiz erfasst.

Der mit der Neighbor-Joining-Methode erstellte Barcoding-Baum ist in Abb. 2 dargestellt. Wie zuvor erwähnt, zeigt sich dort, dass höhere taxonomische Gruppierungen durch die Barcodes nicht zuverlässig dargestellt werden. So werden Gryllidae und mehrere Unterfamilien von Tettigoniidae (Tettigoniinae, Phaneropterinae, Conocephalinae) und Acrididae (Oedipodinae) nicht als monophyletisch erkannt. Dies liegt daran, dass das COI-Gen im Vergleich zwischen phylogene-

tisch weit voneinander entfernten Arten mit Mutationen saturiert und damit nicht mehr informativ ist, so dass die Zuordnungen auf diesen Ebenen tendenziell zufällig geschehen. Auf Artniveau wurde meist BIN-Konkordanz festgestellt, d.h. alle Barcodes einer Art formen eine BIN und diese BIN enthält ausschließlich die Barcodes einer Art. Bei zahlreichen Arten trat jedoch BIN-Diskordanz auf.

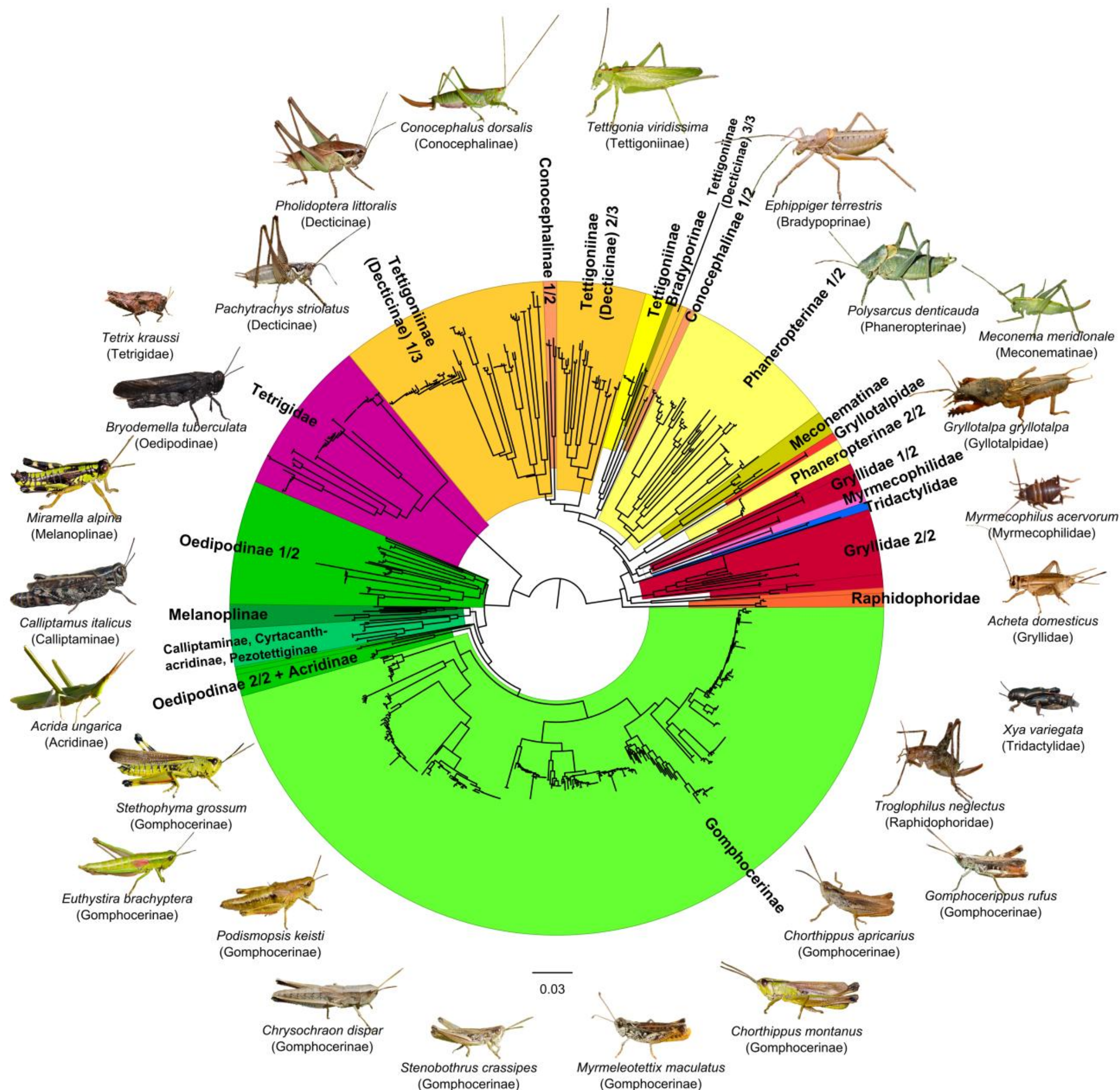



Abb. 2: DNA-Barcoding-Baum der mitteleuropäischen Heuschrecken, erstellt in BOLD und dargestellt mit FigTree 1.4.2 (aktualisiert nach HAWLITSCHEK et al. 2017). Alle Arten werden als separate Cluster abgebildet; so sind die Barcodes verschiedener Arten unterscheidbar. Auf höherer taxonomischer Ebene weicht die Darstellung von den realen Verwandtschaftsverhältnissen ab. DNA-Barcoding allein ist also nicht zur Rekonstruktion tieferer Phylogenien geeignet.

Bei 13 Arten wurden zwei BINS gefunden (*Bryodemella tuberculata*, *Calliptamus barbarus*, *Calliptamus italicus*, *Chorthippus pullus*, *Euchorthippus declivus*, *Miramella alpina*, *Oedaleus decorus*, *Leptophyes albovittata*, *Pholidoptera littoralis*, *Poecilimon schmidtii*, *Barbitistes serricauda*, *Platycleis albopunctata*, *Polysarcus denticauda*), bei zwei Arten sogar drei BINs (*Oecanthus pellucens*, *Isophya modestior*). In manchen Fällen erlaubt diese BIN-Diskordanz eine geografische

Zuordnung. So konnten z.B. bei *Oecanthus pellucens* die drei BINs den Regionen Venetien, Toskana (beide Italien) und Regensburg zugeordnet werden. Dabei ist bemerkenswert, dass die BIN von Venetien auch Barcodes von Tieren enthält, die in München gesammelt wurden. *O. pellucens* besiedelt in München v.a. Gleisgelände und teilt diesen Lebensraum mit Mauereidechsen (*Podarcis muralis* Komplex). Die Münchner Populationen dieser Reptilien werden der Venetien-Linie zugeordnet (HAWLITSCHEK et al. 2016a, 2016b), haben also wahrscheinlich die gleiche Herkunft wie *Oecanthus pellucens* und sind womöglich auf dem gleichen Weg aus ihrer südeuropäischen Heimat nach Deutschland gelangt. Im Fall von *Pholidoptera littoralis* konnte nur eine Unterscheidung zwischen der Nominatform und der Unterart *Ph. littoralis insubrica* aus der Schweiz getroffen werden. Dabei fallen die Münchner Individuen zur Nominatform.

In vielen Fällen ist es schwer, zu beurteilen, ob BIN-Diskordanz tatsächliche Diversität widerspiegelt oder nur das Resultat von NUMTs ist. In der Gattung *Calliptamus* beispielsweise wurden je zwei BINs bei *C. barbarus* und *C. italicus* gefunden. Bei *C. barbarus* repräsentieren die beiden BINs zwei klar getrennte genetische Cluster aus je zwei Barcodes, die aber im Schwestergruppenverhältnis zueinander stehen. Ein Cluster gehört zu einer Population aus der Schweiz, das andere zu einer aus Ungarn. Bei *C. italicus* hingegen wird eine BIN aus einem einzelnen, weit abseits stehenden Barcode gebildet. Es ist daher möglich, dass dieser Barcode ein NUMT darstellt, das trotz aller beschriebenen Vorsichtsmaßnahmen nicht aussortiert werden konnte.

In der Praxis stellt BIN-Sharing ein weit größeres Problem dar, da dabei eine BIN mehr als eine Art enthält. Diese Arten sind daher im Barcoding nicht oder nicht ohne weiteres zu unterscheiden. In manchen Fällen bilden die Barcodes der betroffenen Arten noch innerhalb einer BIN Cluster, so dass trotz BIN-Sharing eine Unterscheidung möglich ist. Oft jedoch sind Barcodes verschiedener Arten innerhalb einer BIN anscheinend zufällig verteilt, oder Arten teilen sogar identische Barcodes. In unserer Studie waren 26 Arten aus zehn Gattungen von BIN-Sharing betroffen (Abb. 3). Mit Ausnahme der Gattung *Tetrix* gehören alle zur Familie Acrididae. Die Arten sind: (i) *Tetrix bipunctata* + *T. kraussi* (2); (ii) *Chorthippus apricarius* + *Ch. biguttulus* + *Ch. brunneus* + *Ch. mollis* + *Gomphocerippus rufus* (5); (iii) *Gomphocerus sibiricus* + *Stauroderus scalaris* (2); (iv) *Ch. dichrous* + *Ch. dorsatus* (2); (v) *Ch. montanus* + *Ch. parallelus* (2); (vi) *Stenobothrus eurasius* + *S. lineatus* + *S. nigromaculatus* + *S. rubicundulus* (4); (vii) *Omocestus haemorrhoidalis* + *O. rufipes* + *O. viridulus* (3); (viii) *Myrmeleotettix maculatus* + *S. crassipes* (2); (ix) *Euchorthippus declivus* + *E. pulvinatus* (2); (x) *Arcyptera fusca* + *A. microptera* (2). In den Fällen i, ii, iv, v, vi und vii lag nicht nur BIN-Sharing, sondern auch Barcode-Sharing vor, was die Unterscheidung der betroffenen Arten verhindert. In den Fällen iii, viii, ix und x hingegen bildeten die betroffenen Arten Cluster innerhalb der BINs, was die Unterscheidung durch die Barcodes erlaubt.

Sowohl bei der Bestimmung der Belegexemplare als auch bei der Auswertung der Sequenzdaten wurden Protokolle angewendet, um Fehlbestimmungen zu vermeiden und NUMTs so weit wie möglich auszuschließen (MOULTON et al. 2010).

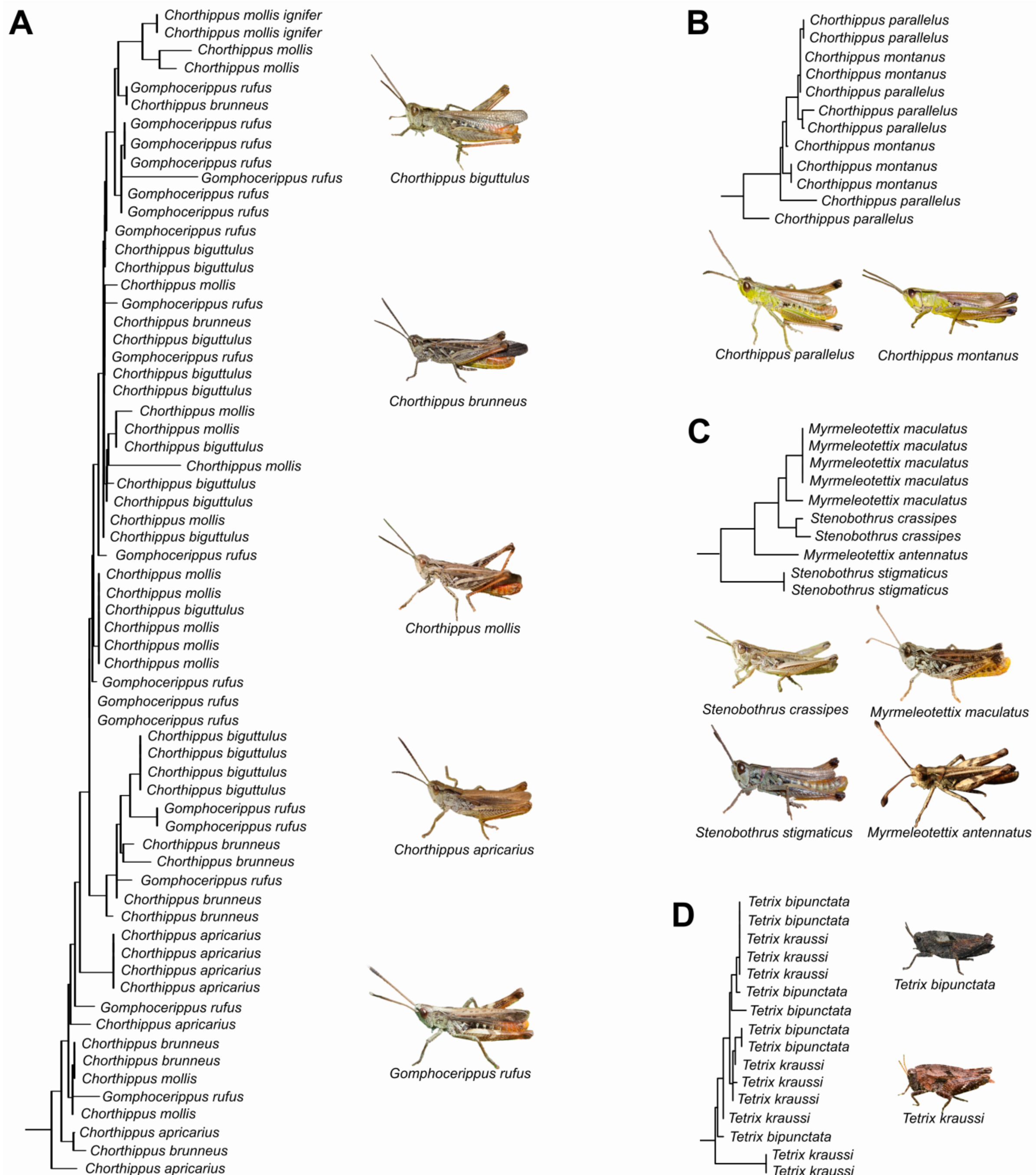



Abb. 3: Insbesondere Kurzfühlerschrecken zeigen auffällig hohe Diskordanz zwischen den erfassten Barcode-Clusters (BINs), die eigentlich Arten entsprechen sollten, und der bestehenden Taxonomie. So teilen sich *Chorthippus biguttulus, Ch. brunneus, Ch. mollis, Ch. apricarius* und *Gomphocerippus rufus* (A) eine BIN. Dieses Phänomen tritt unter anderem auch zwischen *Ch. parallelus* und *Ch. montanus* (B), *Stenobothrus crassipes* und *Myrmeleotettix maculatus* (C) sowie *Tetrix bipunctata* und *T. kraussi* auf.

Wir gehen daher davon aus, dass das festgestellte hohe Maß an BIN-Diskordanz (insbesondere BIN-Sharing) eine biologische und keine technische Ursache hat. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass es sich bei den betroffenen Arten um evolutionär sehr junge Arten handelt, so dass sich noch keine klaren genetischen Unterschiede in den untersuchten, neutral evolvierenden Genregionen heraus-

gebildet haben (CARSTENS & KNOWLES 2007). Darüber hinaus kann auch Hybridisierung eine Rolle spielen, die z.B. bei *Ch. biguttulus* / *Ch. brunneus* und bei *Ch. parallelus* / *Ch. montanus* bereits bekannt ist (GOTTSBERGER & MAYER 2007, HOCHKIRCH & LEMKE 2011). Schließlich kann auch die Infektion durch *Wolbachia*-Bakterien eine Rolle spielen, die bei vielen Insekten Auswirkungen auf Genfluss und Reproduktion hat (BELLA et al. 2010). Weiterführende Studien dieser Phänomene mittels genomischer Daten sind geplant.

Insgesamt konnten 76,2% aller untersuchten Heuschreckenarten durch DNA-Barcoding eindeutig bestimmt werden. Dieser Wert liegt deutlich unter dem anderer Insektengruppen, wie Lepidoptera (98%: HAUSMANN et al. 2013), Coleoptera (92%: HENDRICH et al. 2015), Heteroptera (91,5%: RAUPACH et al. 2014), Neuroptera (90%: MORINIÈRE et al. 2014) und apoider Hymenoptera (SCHMIDT et al. 2015). Bei diesen Gruppen bietet das Barcoding eine wertvolle Hilfe, um gerade schwer bestimmbare Arten sicher zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu leistet das Barcoding innerhalb der Heuschrecken gerade bei Gruppen morphologisch ähnlicher Arten wie um *Ch. biguttulus*, bei *Ch. parallelus* + *Ch. montanus*, sowie in den Gattungen *Stenobothrus* und *Omocestus* keine Unterstützung. Deutlich wird, dass all diese Fälle von Barcode Sharing bei Caelifera auftreten, während bei Ensifera alle untersuchten Arten durch Barcoding eindeutig bestimmt werden konnten. Somit liegt die Bestimmungsrate bei Caelifera nur bei 59,1%, bei Ensifera hingegen bei 100%.

Zusammenfassend stellen Orthopteren ein lehrreiches Beispiel sowohl für die relativ simple Anwendbarkeit des Barcoding als auch für die damit verbundenen Probleme dar. Während bei Langfühlerschrecken eine exzellente Identifikationsrate von 100% erreicht wird, stößt die Methode bei Kurzfühlerschrecken viel schneller als bei den meisten anderen Insektengruppen an ihre Grenzen. Dieses scheinbare Scheitern zeigt aber wiederum neue Ansätze sowohl zur Ergänzung und Weiterentwicklung der Barcoding-Methodik als auch zur evolutionsbiologischen Erforschung der Ursachen auf. Heuschrecken haben sich also auch in diesem Fall als vielseitige und interessante Studienorganismen erwiesen.

## Dank

Wir bedanken uns bei Manfred Alban Pfeifer, Bobenheim-Roxheim, für das Bereitstellen der Arten *Ephippiger diurnus* und *Phaneroptera nana*. Andreas Dunz, München, danken wir für seine umfangreichen Tätigkeiten beim Barcoding-Projekt. Dem BOLD-Team (Guelph, Canada) danken wir für die Bearbeitung der Proben und für die Pflege der Datenbank. Die Regierungsbezirke von Bayern stellten dankenswerterweise Genehmigungen zum Sammeln der verwendeten Proben aus. Die Barcoding-Projekte in Bayern und Deutschland werden vom Bayerischen Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst bzw. vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

Verfasser:
Oliver Hawlitschek, Stefan Schmidt, Frank Glaw & Jérôme Morinière
Zoologische Staatssammlung
München (SNSB-ZSM)
Münchhausenstr. 21
81247 München
E-Mail (korresp. Autor): oliver.hawlitschek@gmx.de

Prof. Dr. Gerlind U. C. Lehmann
Humboldt-Universität zu Berlin
Institut für Biologie
Invalidenstr. 43
10115 Berlin
E-Mail: gerlind.lehmann@biologie.hu-berlin.de

Dr. Arne W. Lehmann
Arbeitskreis Heuschrecken Brandenburg und Berlin
Friedensallee 37
14532 Stahnsdorf
E-Mail: heuschrecken-brandenburg@web.de

## Literatur

BELLA, J.L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, P., ARROYO-YEBRAS, F., BERNAL, A., SARASA, J., FERNÁNDEZ-CALVÍN, B., MASON, P.L. & ZABAL-AGUIRRE, M. (2010): *Wolbachia* infection in the *Chorthippus parallelus* hybrid zone: Evidence for its role as a reproductive barrier. – Journal of Orthoptera Research 19: 205–212.

BENSON, D.A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J. & SAYERS, E.W. (2013): GenBank. – Nucleic Acids Research 41, 36–42.

BERTHIER, K., CHAPUIS, M.-P., MOOSAVI, S.M., TOHIDI-ESFAHANI, D. & SWORD, G.A. (2011): Nuclear insertions and heteroplasmy of mitochondrial DNA as two sources of intra-individual genomic variation in grasshoppers. – Systematic Entomology 36: 285–299.

BOULTER, D., RAMSHAW, J.A.M., THOMPSON, E.W., RICHARDSON, M. & BROWN, R.H. (1972): A phylogeny of higher plants based on the amino acid sequences of cytochrome c and its biological implications. – Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 181: 441–455.

BROWN, J.M., PELLMYR, O., THOMPSON, J.N. & HARRISON, R.G. (1994): Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. – Molecular Biology and Evolution 11: 128–141.

CARSTENS, B.C. & KNOWLES, L.L. (2007): Estimating species phylogeny from gene-tree probabilities despite incomplete lineage sorting: an example from *Melanoplus* grasshoppers. – Systematic Biology 56: 400–411.

DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G.R. & THORPE, R.S. (2007): Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. – Forensic Science International 173: 1–6.

GOTTSBERGER, B. & MAYER, F. (2007): Behavioral sterility of hybrid males in acoustically communicating grasshoppers (Acrididae, Gomphocerinae). – Journal of Comparative Physiology 193: 703–714.

HAJIBABAEI, M., SINGER, G.A.C., HEBERT, P.D.N. & HICKEY, D.A. (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. – Trends in Genetics 23: 167–172.

HAUSMANN, A., CHARLES, H., GODFRAY, J., HUEMER, P., MUTANEN, M., ROUGERIE, R., VAN NIEUKERKEN, E.J., RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2013): Genetic patterns in European geometrid moths revealed by the Barcode Index Number (BIN) system. – PLoS ONE 8: e84518.

HAWLITSCHEK, O., FRANZEN, M. & GLAW, F. (2016a): DNA-Barcoding der Amphibien und Reptilien Deutschlands. – Zeitschrift für Feldherpetologie 23: 141–158.

HAWLITSCHEK, O., MORINIÈRE, J., DUNZ, A., FRANZEN, M., RÖDDER, D., GLAW, F. & HASZPRUNAR, G. (2016b): Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany. – Molecular Ecology Resources 16: 242–253.

HAWLITSCHEK, O., MORINIÈRE, J., LEHMANN, G.U.C., LEHMANN, A.W., KROPF, M., DUNZ, A., GLAW, F., DETCHAROEN, M., SCHMIDT, S., HAUSMANN, A., SZUCSICH, N.U., CAETANO-WYLER, S.A. & HASZPRUNAR, G. (2017): DNA barcoding of crickets, katydids and grasshoppers (Orthoptera) from Central Europe with focus on Austria, Germany and Switzerland. – Molecular Ecology Resources 17: 1037–1053.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. – Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270: 313–321.

HEBERT, P.D.N. & GREGORY, T.R. (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. – Systematic Biology 54: 852–859.

HEBERT, P.D.N., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H. & HALLWACHS, W. (2004): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 14812–14817.

HENDRICH, L., MORINIÈRE, J., HASZPRUNAR, G., HEBERT, P.D.N., HAUSMANN, A., KÖHLER, F. & BALKE, M. (2015): A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. – Molecular Ecology Resources 15: 795–818.

HOCHKIRCH, A. & LEMKE, I. (2011): Asymmetric mate choice, hybridization, and hybrid fitness in two sympatric grasshopper species. – Behavioral Ecology and Sociobiology 65: 1637–1645.

LEHMANN, A., DEVRIESE, H., TUMBRINCK, J., SKEJO, J., LEHMANN, G.U.C. & HOCHKIRCH, A. (2017): The importance of validated alpha taxonomy for phylogenetic and DNA barcoding studies: a comment on species identification of pygmy grasshoppers (Orthoptera, Tetrigidae). – ZooKeys 679: 139–144.

MORINIÈRE, J., CANCIAN DE ARAUJO, B., LAM, A.W., HAUSMANN, A., BALKE, M., SCHMIDT, S., HENDRICH, L., DOCZKAL, D., FARTMANN, B., ARVIDSSON, S. & HASZPRUNAR, G. (2016): Species identification in malaise trap samples by DNA barcoding based on NGS technologies and a scoring matrix. – PLoS ONE 11: e0155497.

MORINIÈRE, J., HENDRICH, L., HAUSMANN, A., HEBERT, P., HASZPRUNAR, G. & GRUPPE, A. (2014): Barcoding Fauna Bavarica: 78% of the Neuropterida fauna barcoded! – PLoS ONE 9: 1–8.

MOULTON, M.J., SONG, H. & WHITING, M.F. (2010): Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: a case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). – Molecular Ecology Resources 10: 615–627.

NAGY, Z.T., BACKELJAU, T., DE MEYER, M. & JORDAENS, K. (2013): DNA barcoding: a practical tool for fundamental and applied biodiversity research. – ZooKeys Editorials.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2007): BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). – Molecular Ecology Notes 7: 355–364.

RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2013): A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system. – PLoS ONE 8: e66213.

RAUPACH, M.J., HENDRICH, L., KÜCHLER, S.M., DEISTER, F., MORINIÈRE, J. & GOSSNER, M.M. (2014): Building-up of a DNA barcode library for true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. – PLoS ONE 9: e106940.

SCHMIDT, S., SCHMID-EGGER, C., MORINIÈRE, J., HASZPRUNAR, G. & HEBERT, P.D.N. (2015): DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: identifications for Central European bees (Hymenoptera, Apoidea partim). – Molecular Ecology Resources 15: 985–1000.

SMITH, M.A., FISHER, B.L., & HEBERT, P.D.N. (2005): DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. – Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360: 1825–1834.

SONG, H., BUHAY, J.E., WHITING, M.F. & CRANDALL, K.A. (2008): Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 13486–13491.

WANG, X., FANG, X., YANG, P., JIANG, X., JIANG, F., ZHAO, D., LI, B., CUI, F., WEI, J., MA, C., WANG, Y., HE, J., LUO, Y., WANG, Z., GUO, X., GUO, W., WANG, X., ZHANG, Y., YANG, M., HAO, S., CHEN, B., MA., Z, YU, D., XIONG, Z., ZHU, Y., FAN, D., HAN, L., WANG, B., CHEN, Y., WANG, J., YANG, L., ZHAO, W., FENG, Y., CHEN, G., LIAN, J., LI, Q., HUANG, Z., YAO, X., LV, N., ZHANG, G., LI, Y., WANG, J., WANG, J., ZHU, B. & KANG, L. (2014): The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight. – Nature Communications 5: 2957.